NEO-SENSITABS™ / MODE D'EMPLOI

Révision	DBV0004F
Date de publication	12.04.2013
Langue	Français

NEO-SENSITABS™

Tests de sensibilité pour antibiogramme

Fabricant

Rosco Diagnostica A/S, Taastrupgaardsvej 30, DK-2630 Taastrup, Danemark, www.rosco.dk

Utilisation prévue

Les comprimés NEO-SENSITABS sont utilisés pour réaliser des tests de sensibilité aux antibiotiques in vitro semi-quantitatifs par la méthode de diffusion du comprimé/ disque sur milieu gélosé, d'organismes non exigeants à croissance rapide, certains pathogènes bactériens exigeants et levures.

Principes de la methode

Des comprimés Neo-Sensitabs contenant une variété d'agents antimicrobiens sont appliqués sur la surface d'un milieu gélosé propre inoculé avec une culture pure provenant d'isolats cliniques.

Organismes non exigeants, y compris *Enterobacteriaceae, Staphylococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Enterococcus* spp. et *Vibrio cholerae*, peuvent être testés sur un milieu ne comportant ni sang, ni autre additif comme le milieu gélosé de Müller-Hinton II (MH). *Haemophilus influenzae* exige un milieu de test Haemophilus (HTM), *Neisseria gonorrhoeae* de GC agar base (GCA), *Streptococcus pneumoniae* et d'autres streptocoques exigent un milieu Müller-Hinton II + 5 % sang (MH+B). Levures doivent être testées sur un milieu RPMI-1640 ou un milieu *shadomy* modifié et les anaérobies nécessitent des procédures spéciales[1,2].

Après incubation, les boîtes de Pétri sont examinées et les diamètres des zones d'inhibition autour des comprimés sont mesurés et comparés aux tableaux interprétatifs de zone pour les antibiotiques considérés individuellement afin de déterminer l'agent ou les agents convenant le mieux pour l'antibiothérapie.

Les comprimés Neo-Sensitabs sont normalisés selon les concentrations critiques recommandés par le CLSI (NCCLS).[3,4] et EUCAST. En outre, les comprimés Neo-Sensitabs sont adaptés aux concentrations critiques recommandés par "Les groupes de normalisation de tests de sensibilité" dans France et Royaume-Uni. On peut trouver les critères interprétatifs des diamètres de zone pour les différents pays dans le Guide Neo-Sensitabs de l'utilisateur (www.rosco.dk).[1]

Réactifs

Les comprimés Neo-Sensitabs ont un diamètre de 9 mm et contiennent des antimicrobiens cristallins soigneusement mélangés à un granulé protecteur. Un code unique à 5 caractères est imprimé des deux côtés du comprimé. Les comprimés Neo-Sensitabs sont livrés en cartouches de 50 comprimés chacune. Les cartouches peuvent être utilisées avec un distributeur Neo-Sensitabs. Les appareils distributeurs délivrent 7, 9, 12 ou 16 comprimés Neo-Sensitabs en une fois et aucune pression supplémentaire sur les comprimés n'est nécessaire car la distribution est automatique.

Stockage/Conservation

1) Dès réception, vérifier le symbole de température sur le récipient extérieur. Les comprimés Neo-Sensitabs portant le symbole de 2 °C à 8 °C doivent être conservés au réfrigérateur et les comprimés Neo-Sensitabs portant 25 °C comme symbole supérieur de température sur le récipient extérieur doivent être stockés à température ambiante.
2) Si les comprimés Neo-Sensitabs sont stockés dans un réfrigérateur, il faudra laisser la cartouche atteindre la température ambiante pendant 30 minutes à 1 heure avant de les ouvrir, afin d'éviter toute condensation d'eau sur les comprimés.
3) Les comprimés Neo-Sensitabs portant un symbole de température situé entre 2°C et 8°C peuvent être laissés à température ambiante pendant 2 mois sans perte d'efficacité notable.
4) Les cartouches ouvertes placées dans le distributeur doivent être utilisées dans les deux mois pour les comprimés Neo-Sensitabs portant le symbole de température 2 °C à 8 °C et dans les 12 mois pour les comprimés Neo-Sensitabs portant le symbole de température inférieur à 25 °C.

La date limite d'utilisation sur les cartouches s'applique seulement aux cartouches intactes conservees à la température correcte.

Précautions d'emploi
Suivre le mode d'emploi. L'efficacité de Neo-Sensitabs ne dépend pas seulement de la charge des comprimés, mais aussi de l'utilisation de paramètres corrects pour : l'inoculum, les boîtes de gélose, la température d'incubation, l'interprétation du diamètre de la zone, l'entreposage, le stockage et la conservation des comprimés Neo-Sensitabs ainsi que de l'utilisation de cultures de contrôle. [5]

Spécimen
Le spécimen doit être absolument typique du lieu de l'infection : il faut donc s'efforcer d'obtenir un échantillon représentatif de la bactérie pathogène correspondante. Voir les instructions sur la préparation de l'inoculum.

METHODE

Matériel fourni : Comprimés Neo-Sensitabs selon l'étiquette.

Matériel nécessaire mais non fourni : Milieu de culture, réactifs, organismes de contrôle de qualité et matériel de laboratoire nécessaire pour réaliser un test de sensibilité par la méthode de diffusion sur milieu gélosé à l'aide d'une procédure standardisée. Préparer une suspension ayant une turbidité correspondant au standard McFarland 0.5 en ajoutant 0,5 ml de 0.048 M $BaCl_2$ (1,175 % poids/volume $BaCl_2 \cdot 2H_2O$) à 99,5 ml de 0.18 M H_2SO_4 (1 % (vol/vol)) tout en mélangeant constamment. Une préparation standard peut également être achetée. Vérifier en utilisant un spectrophotomètre ayant un faisceau optique de 1 cm et une cuvette adaptée; l'absorbance à 625 nm doit être de 0,08-0,10.[3,4]

I. Mode d'emploi / Bactéries

I.1. Standardisation de l'inoculum selon les directives CLSI (NCCLS) [3] et EUCAST

Méthode directe de suspension des colonies:
Une turbidité équivalente à la norme $BaSO_4$ (McFarland 0.5) peut être développée en faisant une suspension avec plusieurs colonies morphologiquement similaires d'une boîte de gélose (18-24 h non sélective) dans une solution de 4-5 ml 0,9 % de NaCl. La méthode est équivalente à la méthode standardisée CLSI (NCCLS) et nécessite moins de temps. L'approche est conseillée pour tester des organismes exigeants tels que *Haemophilus* spp., *N. gonorrhoeae*, *Moraxella catarrhalis*, les pneumocoques/ streptocoques ainsi que les staphylocoques à la recherche d'une possible méticillinorésistance ou d'une résistance à l'oxacilline.[3]

I.2. Ensemencement

a) Dans les 15 minutes qui suivent, tremper un ecouvillon stérile dans la suspension préparée et retirer l'exces d'inoculum en appuyant fermement sur les parois du tube.
b) Dans les 15 minutes suivantes, les ecouvillons sont utilisés pour inoculer les boites de Pétri.
c) Inoculer la surface séchée de la boîte de gélose appropriée en striant lecouvillin sur la totalité de la surface. Laisser sécher la surface pendant 3 à 5 minutes ou 15 minutes au maximum avant de déposer les comprimés Neo-Sensitabs sur le milieu.
d) Sélectionner les comprimés appropriés tels que ceux recommandés par les critères CLSI (NCCLS).[6] Pour l'étude de *H. influenzae, N. gonorrhoeae,* et *Streptococcus* spp. ne pas utiliser plus de neuf (9) Neo-Sensitabs par boîte de 150 mm ou quatre (4) Neo-Sensitabs par boîte de 100 mm.

I.3. Incubation et lecture des boîtes

a) Dans les 15 minutes, placer la boîte de gélose, avec la côté gélose en haut, dans un incubateur à 35 °C. *Haemophilus* spp., *N. gonorrhoeae*, *S. pneumoniae* et autres streptocoques doivent être étuvés dans une atmosphère enrichie à 5 % de CO_2.
b) Examiner les boîtes après 16 à 18 heures d'incubation (20 – 24 h pour *N. gonorrhoeae*, *S. pneumoniae* et autres streptocoques). Une incubation de 24 heures complètes est recommandée pour la détection de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (MRSA) et pour la résistance à la vancomycine *de Enterococcus* spp. . Tenir la boîte face à la lumière transmise et examiner les zones de l'oxacilline et de la vancomycine à la recherche d'une légère croissance (colonies minute) de colonies résistant respectivement à la méthicilline ou à la vancomycine, dans les zones apparentes d'inhibition. Toute croissance discernable dans la zone d'inhibition indique la résistance à la méthicilline ou à la vancomycine. Les bords de la zone d'inhibition contiennent un grand nombre de petites colonies lorsqu'on utilise des comprimés de triméthoprime, sulfamides et de triméthoprime + sulfaméthoxazole. Dans ce cas,

les zones d'inhibition sont mesurées jusqu'aux colonies de taille normale (ne pas tenir compte de la légère croissance et mesurer la marge la plus évidente). Pour plus de détails, lire le Guide de l'utilisateur Neo-Sensitabs (www.rosco.dk).[1]

c) Les diamètres des zones d'inhibition totale sont mesurés sur la base de l'inspection visuelle générale. Les zones sont mesurées jusqu'au millimètre entier le plus proche.

II. Mode d'emploi / levure

II.1. Préparation de l'inoculum

L'inoculum devrait uniquement se traduire par une croissance confluente. Pour la plupart des souches, l'inoculum devrait contenir environ $5x10^5$ d'UFC/ ml (McFarland 0,5 dilué 1+1 avec une solution saline). Pour *Candida krusei,* utiliser un équivalent inoculum à McFarland 0.5, dilué à 1/10, et pour *Cryptococcus* spp., utiliser un équivalent inoculum à McFarland 1,0, non dilué.

II.2. Ensemencement

a) Les boîtes sont séchées pendant 20 à 25 minutes à 35 °C avant l'inoculation.
b) Verser 0.5 ml (boîte de 9 cm) or 1.0 ml (boîte de 14 cm) de l'inoculum préparé sur la surface de la gélose (noyage), et le liquide excédentaire est aussitôt enlevé avec une pipette.
c) La boîte ouverte est séchée pendant 10 minutes à 35 °C, et les comprimés sont placés à la surface de la gélose.

II.3. Incubation et lecture des boîtes

L'incubation à 35 °C pendant la nuit convient pour la plupart des souches isolées dans des infections systémiques. L'examen et la lecture de la boîte doivent avoir lieu au bout de 18 à 24 heures. Si la croissance n'est pas encore visible sur des souches particulières, on peut réincuber les boîtes pendant une durée allant jusqu'à 24 heures supplémentaires. Pour *Cryptococcus* spp. incuber à 30 °C pendant 42 à 48 heures.

II.4. Mesure des zones d'inhibition

Pour les antifongiques de structure polyènique (amphotéricine B et nystatine), mesurer la zone claire sans croissance visible à l'intérieur. Les colonies présentes à l'intérieur de la zone doit être considérées comme étant des mutants résistants. Pour les azolés, imidazoles et terbinafine, les zones doivent être mesurées jusqu'aux colonies de taille normale. Il y a souvent une zone de croissance de colonies partiellement inhibées, dont la taille est plus faible à proximité du comprimé qu'au bord de la zone réelle. Les colonies de taille petite et moyenne ne sont pas des mutants résistants. Les comprimés Neo-Sensitabs imidazoles/azolés contiennent de la doxycycline afin d'améliorer la qualité de lecture de leurs zones. Pour la fluorocytosine, mesurer la zone jusqu'aux colonies de taille normale. Les colonies individuelles à l'intérieur de la zone sont habituellement des mutants *résistants* (ils doivent être isolés et testés à nouveau).

CONTRÔLE DE QUALITÉ INTERNE

Les procédures de contrôle de qualité utilisant des souches ATCC doivent être entreprises au moins une fois par semaine, et chaque fois qu'un nouveau lot de gélose est introduit. Le diamètre mesuré devrait respecter les limites du diamètre de la zone de contrôle pour la combinaison spécifique de Neo-Sensitabs et de souches de contrôle. Les limites des souches de contrôle sont fixées dans les tableaux et indiquent le fonctionnement correct de toute la procédure.[1,3]

RÉSULTATS

Comparer le diamètre de zone enregistré avec celui des tableaux. Les résultats obtenus avec un organisme spécifique peuvent être déclarés Sensibles (S), Intermédiaires (I) or Résistants (R)[3]:

Sensibles (S): On peut s'attendre à ce que l'infection causée par la souche testée réagisse à une dose normale de l'agent antimicrobien présent dans le comprimé.

Critères "S" sont spécifiés seuls : Pour certaines combinaisons d'organismes/ antimicrobiens, l'absence de souches résistantes empêche la définition de toute catégorie autre que « Sensible ». Pour les souches produisant des résultats suggérant "non sensibles", les résultats des tests d'identification des organismes et de sensibilité antimicrobienne doivent être confirmés. Par la suite, les organismes isolés doivent être soumis à un Laboratoire de référence pour des essais plus poussés.

Intermédiaire (I): La catégorie intermédiaire implique de la substance l'utilisation en clinique sur les sites corporels où les médicaments sont concentrés (par ex. l'urine) ou lorsqu'une dose élevée d'un produit antimicrobien peut être utilisé (par ex. bétalactames). La catégorie intermédiaire comprend également une "zone tampon", qui devrait empêcher les petits facteurs

techniques incontrôlés de provoquer des divergences significatives dans les interprétations ; ainsi, lorsqu'une zone tombe dans la gamme intermédiaire, les résultats peuvent être considérés comme équivoques, et si des médicaments alternatifs ne sont pas disponibles, la réalisation d'une CMI peut être indiquée.
Résistant (R): Dans ce cas, le produit antimicrobien ne peut pas être recommandé pour un traitement.

Dépistage et tests de confirmation pour les bêta-lactamases à large spectre (ESBL- Extended-Spectrum Beta-Lactamases)
Les bêta-lactamases transférables d'origine plasmidiques, qui créent une résistance à l'égard des céphalosporines de troisième génération et monobactames (par ex. aztréoname), ont été décrites chez *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli* et autres Entérobacteriacées. Ces enzymes sont classées comme bêta-lactamases à large spectre (ESBL), et ont été impliqués dans la résistance clinique aux monolactames et aux céphalosporines à large spectre. Certaines de ces souches manifesteront des zones d'inhibition inférieures à celles des souches normales sensibles, mais supérieures aux concentration critiques standard pour certaines céphalosporines à large spectre ou pour l'aztréoname. Ces souches peuvent être dépistées en utilisant les concentration critiques appropriés pour les ESBL. La plupart des ESBL sont inhibés par l'acide clavulanique, le tazobactame ou le sulbactame, et peuvent être aisément détectés par le test de synergie à double disque (comprimé).[6] Céftazidime + clavulanate et Céfepime + Clavulanate sont très utiles pour les tests de confirmation de l'ESBL. Pour obtenir plus d'informations, lire le Guide de l'utilisateur Neo-Sensitabs (www.rosco.dk).[1] Toutes les souches d'ESBL doivent être déclarées résistantes à toutes les pénicillines, aux céphalosporines et à l'aztréoname.

Staphylocoques résistants à la méthicilline
Le dépistage de la résistance de type MRSA et à la méthicilline (oxacilline) dans les staphylocoques coagulase négatifs doit être effectué en utilisant d'oxacilline 1 µg et de la céfoxitine. La résistance indique que tous les bêta-lactames doivent être donnés comme résistants. Pour obtenir plus d'informations, lire le Guide de l'utilisateur Neo-Sensitabs (www.rosco.dk).[1]

Les staphylocoques aureus à sensibilité diminuée à la vancomycine (hVISA, VISA(GISA) et VRSA)
La résistance à la vancomycine des Staphylocoques aureus (VRSA) doit être recherchée à l'aide de la Vancomycine 5 µg mais la capacité des disques de détecter VRSA est méconnue (e.a. pas évalué car il n'y a que quelques cas de VRSA isolés à travers le monde). Les souches à sensibilité réduite à la Vancomycine (hVISA et VISA(GISA)) ne peuvent donc être détectées par la méthode classique de diffusion. Des informations complémentaires peuvent être obtenue dans le Guide de l'utilisateur Neo-Sensitabs ou sur le site web: www.rosco.dk.[1]

Entérocoques résistants à la Vancomycine (VRE -Vancomycin resistant enterococci)
La détection de VRE par la méthode de diffusion nécessite les étapes suivantes :

1) Comprimés Neo-Sensitabs Vancomycine 5 µg ,
2) Incubation pendant 24 heures complètes,
3) Examen attentif de la zone d'inhibition.

Les souches sensibles présentent un bord net dans la zone, tandis que les souches résistantes ont un bord flou. Pour obtenir plus d'informations, lire le Guide de l'utilisateur Neo-Sensitabs (www.rosco.dk).[1]

Résistance de haut niveau aux aminoglycosides (HLR - High-level aminoglycoside resistance)
La résistance de haut niveau aux aminoglycosides indique qu'un isolat d'entérocoque ne sera pas touché de manière synergique par une combinaison pénicilline ou glycopeptide plus aminoglycoside. Le dépistage de la résistance de haut niveau à la gentamicine et à la streptomycine devra être effectuée sur les isolats d'entérocoques d'origine sanguine ou du LCR (liquide céphalo-rachidien). Des comprimés Neo-Sensitabs à teneur élevée, tels que la Gentamicine 250 µg, la Kkanamycine 500 µg et la Streptomycine 500 µg, sont utilisés pour le dépistage de ce type de résistance.

LIMITATIONS DES MÉTHODES DE DIFFUSION

Les comprimés Neo-Sensitabs ont pour objet de proposer des essais de sensibilité antimicrobienne rapides et précis. Des résultats acceptables tirés des souches de contrôle de qualité ne garantissent pas de résultats précis avec tous les isolats de patients. Lorsqu'on obtient des résultats atypiques ou incohérents, il faut recommencer les essais et/ou refaire les procédures d'identification pour garantir des résultats précis. Il faudra envisager de rendre compte des résultats inattendus, et les isolats pourraient être envoyés à des laboratoires de référence pour des essais plus poussés.

Des résultats dangereusement trompeurs peuvent être obtenus lorsque certains antimicrobiens sont testés sur des micro-organismes spécifiques.[3,6] Des mécanismes de résistance dans certaines espèces sont plus difficiles à détecter que d'autres, et certains résultats peuvent paraître actifs in vitro, même si les agents antimicrobiens ne sont pas efficaces sur le plan clinique. Ces combinaisons comprennent les exemples suivants :

- Tous les antibiotiques de la famille des bêta-lactamines (à l'exception de l'oxacilline, de la méthicilline) sur les

staphylocoques résistants à la méthicilline.
- Les céphalosporines, les aminoglycosides (à l'exception des essais de résistance à niveau élevé), la clindamycine et l'association triméthoprime + sulfaméthoxazole sur les entérocoques
- Les céphalosporines de première et deuxième génération et les aminoglycosides sur *Salmonella* spp. et *Shigella* spp.
- Les céphalosporines sur *Listeria* spp.
- Profil des Glycopeptides pour *S. aureus* à sensibilité réduite à la Vancomycine.
- Céphalosporines et atréonam contre des *E. coli*, *K. pneumoniae* and *P. mirabilis* produisant des BLSE.

Les rapports de routine sur les résultats des souches isolées du LCR pourraient être dangereusement trompeurs pour le traitement des patients lors de l'utilisation des substances suivantes :

- Substances administrées uniquement par voie orale
- Céphalosporines de première et deuxième génération (à l'exception du céfuroxime sodium)
- Clindamycine
- Macrolides
- Tétracyclines
- Fluoroquinolones

Certains antimicrobiens sont associés à l'émergence de résistance durant un traitement prolongé. Par conséquent, les isolats initialement déclarés « sensibles » peuvent devenir résistants au bout de quelques jours après l'initiation du traitement. Ceci se produit le plus fréquemment sur les souches suivantes:

- *Enterobacter*, *Citrobacter*, et *Serratia* spp. avec les céphalosporines de troisième génération
- *Pseudomonas aeruginosa* avec la plupart des antimicrobiens
- Les staphylocoques avec des quinolones

Tous les isolats de *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Providencia* spp., *Proteus* spp. (à l'exception de *P. mirabilis*), *Serratia marcescens*, *P. aeruginosa*, disposent des gènes pour la production des bêta-lactamases du Groupe I. Par conséquent, il n'y a pas d'information utile pour la démonstration in vitro de l'induction enzymatique. Les laboratoires devraient mettre l'accent sur la répétition de l'examen microbiologique (tous les 3 ou 4 jours) des isolats recueillis de manière répétée sur des patients durant le traitement, afin de détecter la sélection des clones qui produisent constitutivement des bêta-lactamases du Groupe I.

RÉFÉRENCES :

1) Neo-Sensitabs User's Guide. 2013. www.rosco.dk.
2) National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2004. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. Approved Standard M11-A6. 6th ed. NCCLS, Wayne, Pa., USA.
3) National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2009. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Approved Standard M2-S10. NCCLS, Wayne, Pa., USA
4) National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for bacteria isolated from animals. Approved Standard M31-A2. 2nd ed. NCCLS, Wayne, Pa., USA.
5) Ericsson H.M. and J.C. Sherris. 1971. Antibiotic susceptibility testing. Report of an international collaborative study. Acta Path. Microbiol. Scand. Sec. B, Suppl. 217: 1-90.
6) Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. 2013. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. M100-S23. 23rd Informational Suppl.. CLSI, Wayne, Pa., USA.